

S36 1 PN=JP 55010583
? t 36/9

36/9/1
DIALOG(R) File 347:JAPIO
(c) 1998 JPO & JAPIO. All rts. reserv.

00522983
ENZYME ELECTRODE AND ITS MANUFACTURE

PUB. NO.: 55-010583 [JP 55010583 A]
PUBLISHED: January 25, 1980 (19800125)
INVENTOR(s): NANKAI SHIRO
NAKAMURA KENICHI
IIJIMA TAKASHI
APPLICANT(s): MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD [000582] (A Japanese Company
or Corporation), JP (Japan)
APPL. NO.: 53-084481 [JP 7884481]
FILED: July 10, 1978 (19780710)
INTL CLASS: [3] G01N-027/30; G01N-027/40; C12Q-001/00
JAPIO CLASS: 46.2 (INSTRUMENTATION -- Testing); 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY --
Microorganism Industry); 42.9 (ELECTRONICS -- Other)
JAPIO KEYWORD: R127 (CHEMISTRY -- Fixed Enzymes)
JOURNAL: Section: P, Section No. 4, Vol. 04, No. 39, Pg. 37, March 28,
1980 (19800328)

ABSTRACT

PURPOSE: To secure a quick and simple measurement of the substrate density as well as to realize the continuous and repetitive use of the enzyme electrode by securing the specific 3-lamination structure and thus giving the electrochemical activity to the substrate which suffers the peculiar catalyst function of the enzyme.

CONSTITUTION: The electron conducting material such as the graphite powder is mixed well with the insoluble redox compound such as bromanil. Then a small amount of such mixture is unified with the electron conducting material through, for example, the press formation. In the moldings thus composed of 1st layer 1 made of the electron conducting material and 2nd layer 2 made of the electron conducting material and the insoluble redox compound, the oxidoreductase like glucose oxidase is fixed on layer 2 via glutaric aldehyde, and then 3rd layer 3 containing enzyme is formed. In such way, the enzyme electrode can be made with the minimum necessary amount of enzyme and the insoluble redox compound.

⑫ 公開特許公報 (A)

昭55-10583

⑤ Int. Cl.³
G 01 N 27/30
27/40
// C 12 Q 1/00

識別記号

府内整理番号
7363-2G
7363-2G
7349-4B

④ 公開 昭和55年(1980)1月25日
発明の数 2
審査請求 未請求

(全 4 頁)

⑤ 酵素電極およびその製造法

② 特 願 昭53-84481

② 出 願 昭53(1978)7月10日

⑦ 発明者 南海史朗

門真市大字門真1006番地松下電器産業株式会社内

⑦ 発明者 中村研一

門真市大字門真1006番地松下電器産業株式会社内

⑦ 発明者 飯島孝志

門真市大字門真1006番地松下電器産業株式会社内

⑦ 出願人 松下電器産業株式会社
門真市大字門真1006番地

⑦ 代理人 弁理士 中尾敏男 外1名

明細書

1. 発明の名称

酵素電極およびその製造法

2. 特許請求の範囲

- (1) 電子伝導性物質からなる第1の層と、電子伝導性物質と不溶性レドックス化合物とからなる第2の層と、前記第2の層上に形成され固定化された酵素を含む第3の層とを有することを特徴とする酵素電極。
- (2) 第3の層が、前記酵素の補酵素を含む特許請求の範囲第1項記載の酵素電極。
- (3) 電子伝導性物質からなる第1の層と不溶性レドックス化合物と電子伝導性物質との混合物からなる第2の層とを一体に成型した後、前記第2の層上に固定化酵素を含む層を設けることを特徴とする酵素電極の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、酵素の特異的触媒作用を受ける基質に対して電気化学的活性を有し、基質の濃度を迅速かつ簡便に測定することができ、しかも連続使

用、繰り返し使用のできる酵素電極を得ることを目的とする。本発明は、また酸素電極などと組み合わせることにより、基質のもつ化学エネルギーを電気エネルギーに変換する電池に用いられる酵素電極に関する。

酵素の有する特異的触媒作用を工業的に利用する試みの一例として、酵素反応系と電気化学反応系を結びつけることにより、酵素と特異的に反応する物質である基質の濃度を検出することが試みられている。酵素反応を電気化学反応として扱うには、例えば、酵素反応系にこれと共に作用する適当なレドックス化合物を介在させ、このレドックス化合物の酸化還元反応を電気化学的に検出する方法が用いられている。具体的には酵素との共役反応で還元(又は酸化)されたレドックス化合物を電気化学的に酸化(又は還元)し、基質濃度をこのとき流れる電流として検出することができる。しかし、高価な酵素やレドックス化合物を溶解した状態で使用するため、これらを測定毎に使い捨てるうことになり、また測定操作も煩雑である。こ

これらの問題を解決し、酵素などの繰り返し使用を可能とし、実用的な酵素電極とするには、酵素、レドックス化合物を集電体としての電子伝導性物質とともに一体固定化する必要がある。

これら酵素、レドックス化合物を一体固定化した酵素電極を得る方法について種々検討した結果、電子伝導性物質として例えばカーボン粉末を用い、これと不溶性レドックス化合物との混合物をプレス成型し、この成型体上に酵素を固定化する方法、あるいは前記混合物中に予め酵素を固定化したカーボン粉末を混合しておき、その後成型体とする方法を見出した。こうして得られた酵素電極は、基質濃度を迅速かつ簡便に測定しうるものであった。

本発明は、この酵素電極を改良して、電子伝導性物質からなる第1の層と、電子伝導性物質と不溶性レドックス化合物とからなる第2の層と、固定化された酵素を含む第3の層とで構成することにより、酵素およびレドックス化合物の使用量を大幅に減少させ、かつ高性能な酵素電極を得ること

に成功したものである。

第1図は本発明による酵素電極の構成の一例を示す。図において、1は電子伝導性物質からなる層、2は不溶性レドックス化合物と電子伝導性物質からなる層、3は固定化された酵素を含む層であり、不溶性レドックス化合物は前記酵素と共に役する。これらの3層は一体成型により構成されている。

層2と3は、基質と酵素およびレドックス化合物の間の反応を行なわせる部分であり、層1は層2と層3の集電体および基体の役割を果たす。これら3層の構成としては第2図に示すように、反応層を両側に設けるなど必要に応じて組み合わせることができる。

このようにして、必要最小限の酵素、不溶性レドックス化合物で電極を構成することができる。

次に酵素電極を用いた測定方法について述べる。第3図に本発明による酵素電極を用いて基質濃度を測定する場合の測定系を示す。図中4は記録計、5はボテンショスタット、6は参照極、7は塩橋、

8は対極、9は上記の酵素電極10を接着した電極ホルダー、11は基質を含むpH 5.6のリン酸緩衝液である。

なお酵素電極10は、固定化された酵素を含む層3が緩衝液11と接触するようにホルダー9に装着され、電子伝導性物質の層1には例えば白金のリードが付けられる。

酵素電極を浸漬後、電極電位を参照極に対して一定電位に保持した後、基質の濃度変化に伴うレドックス化合物の酸化還元電流の変化量を検出する。基質の単位濃度当たりの電流変化量が大きいほど、また、基質濃度と電流変化量の間の直線関係が基質濃度のより広範囲にわたって成立するほど酵素電極の性能が良いと言える。

本発明の酵素電極においては、固定化酵素層が試料溶液に接しており、基質は酵素層内を拡散して電極内部へ達し、反応にあずかる。すなわち、酵素層により基質の移動が制御されるので、比較的高濃度の基質に対しても先に述べた直線関係が維持される。また一方、この酵素電極では、少量

の酵素、レドックス化合物を電子伝導性物質とともに最適な構成としているので、高価な酵素、レドックス化合物の有効利用を図ることができる。電子伝導性物質としては酸化還元に対して安定な金属や、カーボン、あるいは酸化スズなどの導電性金属酸化物を用いることができる。特にカーボンは安定な良導電性物質であり、加えて酵素反応を阻害することもないなど、電子伝導性物質として好ましい。

次にこの酵素電極の製造法について説明する。まず、粉末状とした電子伝導性物質と不溶性レドックス化合物を十分混合する。次にこの混合物の少量と電子伝導性物質とを例えばプレス成型などにより一体成型する。この場合、成型体の強度を上げるために、適当な接着剤を用いてもよい。こうして得られた、電子伝導性物質から成る層と、電子伝導性物質と不溶性レドックス化合物とからなる層の2層から構成される成型体において、不溶性レドックス化合物を含有する層の上に、酵素、必要ならば補酵素をも含めて固定化する。

酵素の固定化には、グルタルアルデヒドなどの架橋試薬による固定化法など、各種の方法を用いることができる。

以下本発明についてその実施例により説明する。電子伝導性物質としてのアセチレンブラック、黒鉛などのカーボン粉末と、不溶性レドックス化合物としてのプロムアニルを十分混合する。次にこの混合物の少量とカーボン粉末をプレス成型により一体成型する。得られた成型体のクロルアニルを含有する層の上へ、酸化還元酵素であるグルコースオキシダーゼをグルタルアルデヒドにより固定化する。この本発明による酵素電極をAとする。

比較のための酵素電極として、カーボン粉末と、予めグルコースオキシダーゼを固定化したカーボン粉末と、プロムアニルとを十分混合した後、プレス成型したものを作製した。この酵素電極をBとする。

上記の酵素電極を用いて、グルコース濃度を 2×10^{-4} モル/lとしたときの電流値の変化を第4図に示す。また、グルコース濃度と電流増加量の

関係を第5図に示す。図より明らかにとく、酵素電極Aは固定化酵素層を有するもののBと同様、基質の添加に対し迅速に応答し、かつ基質濃度変化に対する応答直線性が向上するなど、優れた特性を有する。

酵素が、アルコール脱水素酵素などのように補酵素を必要とする場合には、酵素とともに補酵素をも固定化しておくと、前記同様に良好な応答特性が得られた。

レドックス化合物としては、プロムアニルの他にクロルアニル、あるいは各種レドックスポリマーなどの不溶性レドックス化合物を用いてもよい。

以上述べたごとく、本発明によれば、酵素、レドックス化合物の有効利用をはかり、きわめて容易に優れた性能を有する酵素電極を得ることができる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の酵素電極の構成例を示す図、第2図は他の構成例を示す図、第3図は基質濃度の測定系を示す図、第4図は酵素電極のグルコ-

スに対する応答特性を示す図、第5図はグルコース濃度と電流増加量との関係を示す。

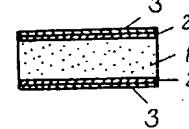
1 …… 第1の層、2 …… 第2の層、3 ……
…第3の層。

代理人の氏名：弁理士 中尾敏男 ほか1名

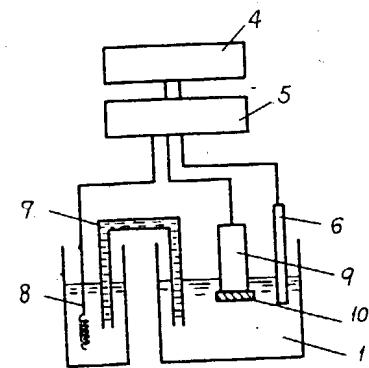
第1図

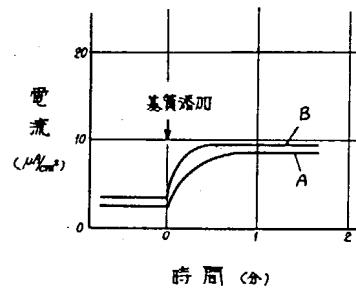


第2図

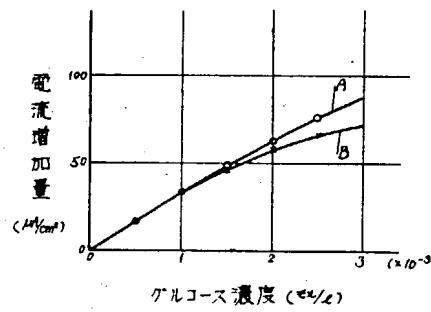


第3図





第 5 図



手続補正書

昭和 64 年 2 月 22 日

特許庁長官殿

1 事件の表示

昭和 53 年 特許願 第 84491 号

2 発明の名称

酵素電極およびその製造法

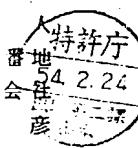
3 補正をする者

事件との関係

特許出願 人 特許庁
住 所 大阪府門真市大字門真 1006 番地

名 称 (582) 松下電器産業株式会社 54.2.24

代表者 山下俊彦



4 代理人 〒 571

住 所 大阪府門真市大字門真 1006 番地
松下電器産業株式会社内氏 名 (5971) 弁理士 中尾敏男 (ほか 1名) 中尾敏男
(印) (ほか 1名) (印)

(連絡先 電話(東京)437-1121 特許分室)

5 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

6 補正の内容

明細書第 7 頁第 9 行の「クロルアニル」を「ブロムアニル」と訂正します。